

## **Stamceller i netthinnen: Muligheter for ny behandling ved retinale sykdommer.**



Senter for øyeforskning,  
Øyeavdelingen, Ullevål Universitetssykehus.

---

av

**Stud.med Gunnar Velde**  
[gunnar.velde@studmed.uio.no](mailto:gunnar.velde@studmed.uio.no)

Veileder

**Dr.med Morten C. Moe**  
Øyeavdelingen, Ullevål universitetssykehus.  
[m.c.moe@medisin.uio.no](mailto:m.c.moe@medisin.uio.no)

---

# INNHALDSFORTEGNELSE:

<b>ABSTRACT:</b>	<b>3</b>
<b>1. INNLEDNING:</b>	<b>4</b>
1.1 Problem og avgrensning av oppgave:	4
1.2 Humane øyets anatomi og embryologi:	4
1.3 Definisjoner:	6
1.4 Forskjellige stamceller:	6
1.5 Historikk:	7
1.6 Hvor i øyet finnes retinale stamceller?	7
1.7 Innledning til eksperimentell studie:	9
<b>2. MATERIALER OG METODER:</b>	<b>9</b>
2.1 Isolering:	9
2.1.1 Postmortem humant vev:	9
2.1.2 Rotteøyne:	10
2.1.3 Videre prosedyre rotte/humant vev:	10
2.2 Lysmikroskopi:	10
2.3 Transmisjon elektron mikroskop (TEM):	11
2.4 Skanning elektronmikroskopi (SEM):	11
2.5 Statistikk:	11
<b>3. RESULTATER:</b>	<b>12</b>
3.1 Enkeltceller blir nevrosfærer:	12
3.2 Cellene skaper en <i>in vitro</i> nisje:	12
3.3 Størrelse på nevrosfærene:	16
<b>4. DISKUSJON:</b>	<b>16</b>
4.1 Eksperimentelt dyreforsøk:	16
4.1.1 Regenerasjon og differensiering:	17
4.1.2 Feilkilder:	18
4.1.3 Ethiske aspekter:	19
4.2 Klinisk bruk av stamceller:	19
4.2.1 Bruk av stamceller generelt:	19
4.2.2 Bruk av stamceller for retinale sykdommer:	19
4.2.2.1 Kontroll av differensiering:	20
4.2.2.2 Transplantasjon:	20
4.2.2.3 Immunologi:	22
4.2.2.4 Behov for studier av større dyr:	22
4.3 Andre strategier:	22
4.3.1 Bruk av stamceller til produksjon av beskyttende faktorer:	22
<b>5. KONKLUSJON:</b>	<b>24</b>
<b>6. TAKK TIL:</b>	<b>24</b>
<b>7. REFERANSER:</b>	<b>24</b>

## **ABSTRACT:**

The discovery of stem cells in the adult retina of mammals, located mostly to the ciliary margin, prompted investigations towards the possibility of using autologous stem cells for treating retinal disorders. In this thesis, we wanted to see if stem/progenitor cells harvested from human – and rat ciliary body could be isolated, display self-renewal and form neurospheres. We also wanted to characterize the histological features of the neurospheres. Further, the thesis addresses some aspects surrounding the use of stem cells for treating retinal disorders.

Cells were isolated from the pigmented ciliary epithelium in adult Brown Norwegian rats and human post-mortem biopsies, and grown using the neurosphere assay. Light microscopy was used to assess the size of the spheres. Transmission/scanning electron microscopy was used for ultrastructural analysis of the neurospheres.

Our findings confirm that the ciliary body of both rats and humans harbours stem/progenitor cells, which readily divide *in vitro* creating neurospheres, in accordance to previous reports. The size of the produced spheres was  $134 \pm 50 \mu\text{m}$  (human) and  $111 \pm 48 \mu\text{m}$  (rat) (passage 1+10 days, mean $\pm$ SD, n=45, p<0.05). The neurospheres displayed features of an *in vitro* stem cell niche, such as extracellular matrix and a hierarchy where the center of the sphere consist of undifferentiated cells, whereas peripheral cells are more differentiated.

Reports indicate that retinal stem cells could be used to treat some of the most common retinal disorders. To collect retinal stem cells, the ciliary body seems suitable since the location favours surgical harvest and the cells are easily grown and expanded *in vitro*.

## **1. INNLEDNING:**

### **1.1 Problem og avgrensing av oppgave:**

Studier har vist at netthinnen hos pattedyr inneholder celler med stamcelle/progenitor-egenskaper, og forskere undersøker om disse retinale stamcellene kan brukes for å utvikle nye behandlingsstrategier mot øyesykdommer.

For å få en praktisk tilnærming har jeg deltatt i en pågående studie med veileder dr.med Morten C. Moe ved Senter for øyeforskning, Øyeavdelingen UUS, hvor har jeg isolert og dyrket frem nevrosfærer fra corpus ciliare hos rotter (Brown Norwegian) og humant post mortem materiale. Hvis man kan få dannet nevrosfærer fra celler i ciliærlegemet til rotte/menneske, viser det at dette organ innehar celler med progenitoregenskaper.

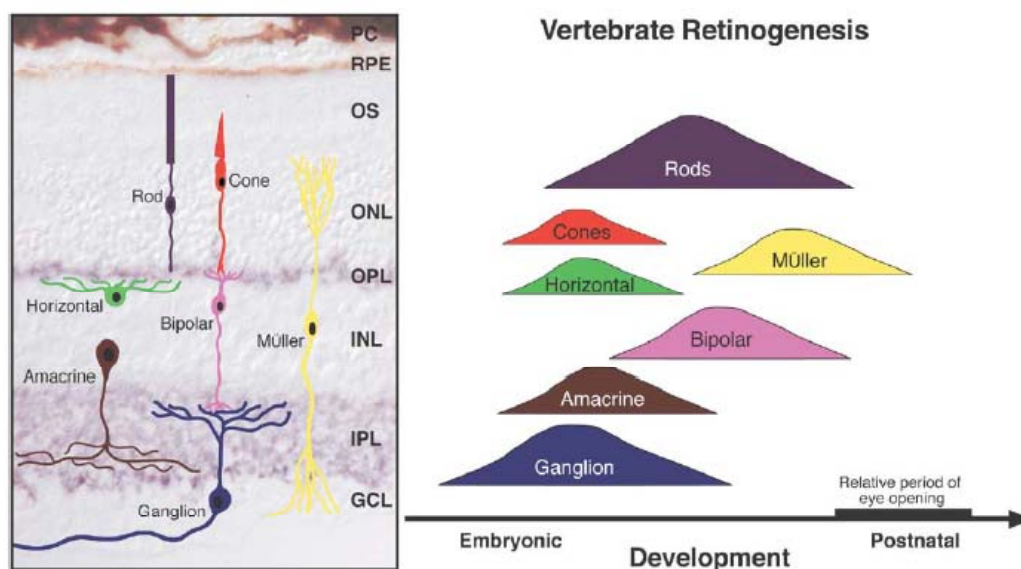
Ved hjelp av den utvalgte litteratur har jeg oppsummert utviklingen av netthinnen, det man vet om stamceller i netthinnen og fremtidig mulig klinisk bruk av retinale stamceller.

### **1.2 Humane øyets anatomi og embryologi:**

Forstadiet til øyet kan finnes i 22 dager gamle embryo (3) (4). Det er et par grunne fordypninger i sidene av forhjernen (proencephalon). Når denne fordypningen vokser, og kommer i kontakt med overflate-ektoderm, induserer den forandringer her, og begynner å invaginere. Overflate ektodermen invaginerer også, men gropen smelter sammen og lager en blære, som avstøtes, og blir til linsen. Etter invaginasjonen av fordypningen av forhjernen danner den to lag, pars pigmentosa (ytte lag) og pars nevrosa (indre lag). Lengst anteriort i øyet, smelter de to lagene sammen, og blir til iris og ciliærlegemet (corpus ciliare). Her er de to lagene fast bundet til hverandre, og funksjonen forutsetter også bidrag fra vev utgått fra mesoderm. Bak ora serrata er de to lagene bare løst bundet til hverandre, bortsett fra rundt papilla nervi optici. Det er altså et potensielt hulrom, det subretinale rom. Ved den patologiske tilstanden amotio retina skjer det en separasjon av disse to lagene, vanligst pga en rift i pars nevrosa. Bak ora serrata utvikler pars nevrosa seg til å bli lagdelt, fra ytterst til innerst; fotoreseptorer (staver og tapper), bipolare celler (1.ordens nevron), og innerst ganglionceller (2.ordens nevron) som med sine aksoner danner n.opticus. Inne i disse lagene finner vi også horisontalceller, amakrine celler (internevroner), og müller celler (gliaceller, med en mekanisk støttende og ernærende

funksjon. Den fullstendige funksjon til müllerceller er enda uklart. Studier tyder på at noen müllerceller har en stamcellefunksjon (5).)

Figur 1 viser pars nevrosas forskjellige celler, og hvordan de er orientert. Figur 1 viser også rekkefølgen de retinale celler dannes under embryogenesen, og hvor lenge de forskjellige cellene dannes.



Figur 1. Retinogenese. Figur fra Klassen et al. (2).

Pars pigmentosa blir til epitelceller (retinalt pigment epitel, RPE), som inneholder melanosomer som danner pigment. Pigmentet absorberer overflødig lys, for å unngå refleksjon tilbake til fotoreseptorene. Videre inneholder pars pigmentosa fagosomer som fjerner avstøtte disci fra staver og tapper. Pigmentepitelet har også en funksjon ved å regenerere all-trans retinal til 1-cis-retinal, som igjen gjenbrukes i staver og tapper for å registrere lys. Pigmentepitelet er altså en viktig del av synsfunksjonen.

Skadet RPE celler og assosiert atrofi er et særlig assosiert med aldersrelatert macula degenerasjon (AMD) (6). Pigmentepitelet hviler fast på bruchs membran, som er basalmembranen til disse to lagene. Den er igjen fast bundet til choroidea. Bruchs membran danner fysiologisk sett en barriere for cellepassasje. (7).

Siden retina dannes av en utposning av forhjernene er retina av nevroektodermal opprinnelse, og således en del av CNS. N.opticus er en sentral ledningsbane/hjernenerve. Dura mater følger nerven og blir til sclera, pia-arachnoidea er homolog med choroidea. Det pigmenterte epitelet i corpus ciliare og posteriore iris er også en del av denne ektodermale opprinnelse.

### **1.3 Definisjoner:**

Det er en del forvirring omkring stamcellebegrepet. En definisjon er en celle som er multipotent, dvs kan bli modne celler av alle vevstyper og kan fornye seg selv gjennom hele livet til en organisme. Det er derfor ganske vanskelig å bevise at en celle er en stamcelle. Derfor er begrepet progenitorcelle nyttig, som er definert som celle som mangler en eller flere av egenskapene til en stamcelle. Da slipper en å bevise regenerasjonsevnen (8). At en celle ikke er en stamcelle etter en streng definisjon, trenger ikke bety at den ikke kan brukes i klinisk sammenheng. En hematopoetisk stamcelle kan ikke dele seg uendelig, da ville det neppe vært noe blodmangel i verden. Allikevel brukes den med stor suksess i behandling av blodsykdommer. En mer pragmatisk definisjon av en stamcelle kan være: En celle som er plastisk, og som kan påvirkes til å reparere sykt vev (2). I det lange løp er det jo den muligheten det medisinske samfunn ønsker.

### **1.4 Forskjellige stamceller:**

Den generelle forskningen på stamceller er todelt – forskning innen vevs spesifikke stamceller, som nevrale, hematopoetiske eller retinale stamceller, og forskning innen stamceller fra embryo, embryonale stamceller. Den siste er knyttet til mange etiske problemer, særlig når det gjelder innenfor human forskning. En embryonal stamcelle kan dele seg uendelig, og kan påvirkes til å bli enhver celletype. De har altså muligheten til å bli tilnærmet perfekte til en terapeutisk rolle.

Meyer har forsøkt å embryoniske stamceller fra mus til å bli nevroner i musemodeller (9). Tre modeller ble brukt; rask degenererende - , langsomt degenererende - og frisk retina. Forsøket var ikke særlig vellykket, mye på grunn av vanskeligheter med å få stamcellene differensiert til den rette fenotypen, og vanskeligheter med å transplantere celler.

Det er en bakdel at man ikke har tilstrekkelig kunnskap til å påvirke embryoniske stamceller til å differensiere i den retning man vil. Dessuten vil alle celler bli påvirket av det miljøet de transplanteres til, og dette samspillet kjenner en ikke fullt ut (1). Cellene kan bli utsatt for en immunreaksjon, eller utvikle seg til tumorceller (9). Derfor kan stamceller fra vev, som allerede er differensiert i en hovedretning, være et vel så godt alternativ til en mulig behandlingsmetode (8).

## 1.5 Historikk:

Før var den alminnelige oppfatningen at det ikke fantes noen regenerativ evne i CNS, inkludert øye. Denne oppfatningen daterer seg tilbake til 1913 da Ramon y Cajal, etter sin anatomiske og fysiologiske karakterisering av sentralnervesystemet sa: “We are born with a certain number of brain cells which decrease with age. Everything must die in the brain or spinal cord - nothing can regenerate” (10).

Altman viste at nye nevroner ble dannet kontinuerlig i hippocampusformasjonen hos voksne rotter (2). Transplantasjon av celler vokste fram over de siste 25 år som et lovende måte for å behandle neurodegenerative sykdommer som Parkinson og Huntingtons sykdom (2, 11). Resultatene til dags dato har vist noe effekt, men mindre enn man kunne håpe på, særlig siden det kreves en komplisert og risikabel intrakraniell prosedyre. Nevrale stamceller er vanskelig tilgjengelig, siden høsting av celler fra humant hjernevev krever avansert kirurgi (2).

Oppdagelsen av nevrale stamceller gjorde at man ville utforske muligheten for stamceller i retina, siden den er av nevroektodermal opprinnelse. Pars pigmentosa og nevrosa viser lite tegn til voksen regenerasjon hos mus/rotter (12). Dette er forskjellig fra andre vertebrale arter der celler i pars nevrosa blir produsert gjennom hele livet, særlig hos noen typer fisk og amfibier. Det var antatt at voksne pattedyr manglet stamceller i retina. I 2000 kom Tropepe et al. med en artikkel der de hadde identifisert retinale progenitorceller hos mus. De var lokalisert til ciliary marginal zone, eller ora serrata. (fig 2[3]). Tropepe konkluderte med at retinale stamceller var bevart gjennom fylogenesen, men hos langlivede arter, hvor tumordannelse var en alvorlig trussel mot artens overlevelse, hadde det dannet seg et hemmende mikromiljø som gjør at stamceller ligger i en inaktiv form. Man kan anta at ved å fjerne det hemmende miljøet, vil stamcellene ha kapasitet til å danne nye retinale celler, noe som er gjort ved å kultivere dem *in vitro*. Dette er blitt gjort i flere studier. (1, 8, 12) Lawrence et al får müllerceller til å dele seg (5). Han foreslår at disse cellene er hemmet av mikromiljøet av en ukjent faktor. Denne tanken om hvilende stamceller støttes også av EJ Mayer (7). Mayer foreslår også at stamcellene kan være skyld i arrdannende øyesykdommer som amotio retinae.

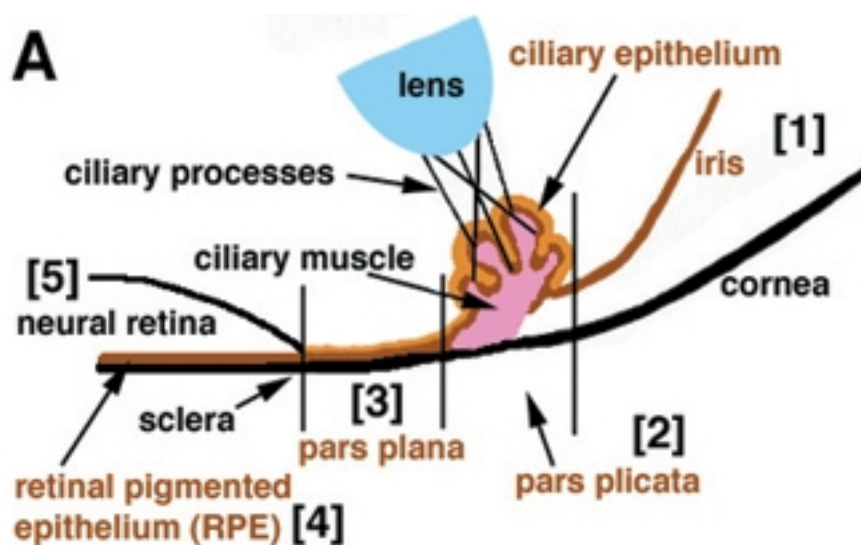
## 1.6 Hvor i øyet finnes retinale stamceller?

Det finnes mange studier vedrørende stamceller i cornea og conjunktiva, disse vil ikke bli omtalt i denne oppgaven. Tropepe fant bare vekst i av retinale stamceller

(RSC) fra corpus ciliare (12). Dette er lokalisasjonen i øyet hvor flest studier har funnet vekst. Tropepe et al estimerte andelen av stamceller til å være 0,6%. Flere forskere har funnet andeler i denne størrelsesorden. Corpus ciliare synes som den beste plassen å høste celler fra, fordi den er lett tilgjengelig for kirurgi (8).

Coles et al. fant at celler fra iris ikke var i stand til å danne sekundære sfærer, som tegn på at de er progenitorceller med begrenset proliferativ kapasitet (1). Sun et al. har fått irisceller til å danne sekundære sfærer (13). Iris hadde vært et enda enklere sted å hente celler fra, da iridectomi på grunn av glaukom er en relativt vanlig prosedyre på øyeavdeliger. Sun et al. sin forskning var basert på iris fra kylling. Ingen andre studier synes å finne stamceller i iris hos pattedyr.

EJ Mayer har fått vekst stamceller fra retina, pars nevrosa (7). Ifølge Lawrence et al. kan disse cellene være müllerceller (5). Med en klonal cellelinje av humane müllerceller klarte Lawrence et al. å gjennomføre 120 passasjer som tilsvarer 600 delinger. Det synes derfor sannsynlig at nevrale retina inneholder noen stamceller, men av mindre antall enn corpus ciliare (7).



Figur 2. Corpus ciliare. Både [2] og [3] inngår i begrepet corpus ciliare. Figur fra Coles et al. (1).

Forskere har prøvd å få nevrale stamceller (NSC) fra hjernen til å gjenoppbygge retina. Liu et al. foreslår NSC som en alternativ kilde til retinale stamceller (14). De viser i sin artikkel at NSC har et bedre potensial både til å formere seg og differensiere seg i forhold til retinale stamceller fra corpus ciliare (forskning på mus). Problemet er, som med embryonale stamceller, at man foreløpig ikke kan styre



differensieringen, og dessuten er høsting av nevrale stamceller fra hjernen en komplisert prosedyre hos mennesker.

### **1.7 Innledning til eksperimentell studie:**

Det var i min og veileders interesse å gjøre et praktisk forsøk til denne oppgaven. I forbindelse med veileders prosjekt har jeg medvirket til å isolere, dyrke og vurdere ciliærlegemets evne til å danne nevrosfærer hos hhv humant post mortem vev og rotte. Nevrosfære essay er en anerkjent metode for å identifisere nevrale progenitorceller (12, 15). Dette var en del av veileders arbeid med å karakterisere den *in vitro* nisje som retinale progenitorceller inntar.

## **2. MATERIALER OG METODER:**

Den eksperimentelle dyrestudien var en del av veileders prosjekt, og det ble utført etter retningslinjene til Helsinki deklarasjonen. Humant vev fra corpus ciliare var tilgjengelig fra postmortem øyne fjernet i forbindelse med hornhinnetransplantasjoner ved Øyeavd, Ullevål Universitetssykehus. Dette er vev som ellers ville bli destruert rett etter operasjonen. Prosjektet er tilrådd av Regional Etisk Komité og Biobank for humant øyevæv opprettet etter godkjenning av Sosial – og helsedirektoratet.

Forsøkene med rotte i prosjektet var godkjent av den lokale forskningskomiteen for dyreforsøk ved Senter for Komparativ Medisin, Rikshospitalet Universitetssykehus.

### **2.1 Isolering:**

#### **2.1.1 Postmortem humant vev:**

Humant postmortem materiale (n=5) ble isolert som tidligere beskrevet (16). Bare donorer uten kjent øyesykdom ble valgt. Gjennomsnittsalder på donorer var 50,8 år (fra 16 – 78 år), og gjennomsnittstid fra død til konservering av vev var 18,5 timer (fra 10 – 32 timer). Corpus ciliare ble identifisert under et disseksjonsmikroskop, ved hjelp av skalpell og pinsett ble pigmentert ciliærepitelet forsiktig dissekert fri fra sclera, iris og linsen, og lagt i petriskål inneholdende Leibowitz-15 medium (L-15) (invitrogen, Carlsbad, CA).

### **2.1.2 Rotteøyne:**

Voksne Brown Norwegian rotter ble avlivet ved dekapitering, og ved hjelp av en butt saks og skalpell ble øynene separert fra hodet og midlertidig plassert i 70% etanol, før man skyllet øynene i L-15. Arbeidet deretter under operasjonsmikroskop, med vevet i L-15 medium. Corpus ciliare ble identifisert etter å ha åpnet øyet ved å kutte langs limbus cornea, samt lagt et hjelpesnitt antero-posteriort mot n.opticus. For å lette arbeidet, fjernet man cornea, iris og linsen. Corpus ciliare ble forsiktig dissekert fra resten av netthinnen og sclera, og lagt i en petriskål inneholdende L-15.

### **2.1.3 Videre prosedyre rotte/humant vev:**

Vevet ble findissekert til mindre biter, og lagt i et rør med tillegg av ca. 8 ml L-15. Titurasjon med engangspipette ble brukt for å dissosiere vevet. Sentrifugerte vevet med 1200 rpm i 5 min. Vevet ble så plassert i dispase (1.24 U/ml, Roche diagnostics, Bael, Switzerland), og lagt i vannbad (37,5°C) for 2x5 min. Alle trinn ble fulgt av grundig titurasjon med pipette. Sentrifugerte i nye 5 min. Vevet ble suspendert som enkelt celler, med en tetthet av  $1 \times 10^5$  celler/ml, i et DMEM/F12 (Gibco Life Tech) basert nevromsfære medium med tillegg av Hepes buffer (1M, 0,8%, Gibco Life Tech), B27 supplement (2%, Gibco Life Tech), EGF (20ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN), bFGF (10 ng/ml, R&D Systems), Heparin (2,5 ug/ml, LEO Pharma), Penicillin-Streptokinase (100 U/ml) og bovint kalveserum (1% PAA Laboratories, Pasching, Austria). Humant vev ble tilsatt Sonic hedgehog, Shh (50 ng/ml, human specific, R&D Systems). Celler ble kultivert i plater med 6 brønner (Ultralow cluster plate, Costar) ved +37 °C i 6% CO<sub>2</sub> og 20% O<sub>2</sub>. Cellekulturene ble matet med bFGF og EGF 2 ganger per uke, og tillegg av DMEM/F12 ble tilsatt 1 gang i uken (15). Sfærene ble passert etter 10-14 dager, før senteret ble nekrotisk, og re-suspendert (sfærer dissosiert til enkeltceller) i 50:50 fersk og kondisjonert nevrosfære medium. Noen kulturer ble fikk vokse noe lenger for å få større sfærer å jobbe med til fiksering.

## **2.2 Lysmikroskopi:**

Nevrosfærer ble fiksert i nøytral buffret 4% paraformaldehyd, lagt i OCT (Tissue TEK, Sakura Finetek, CA), kuttet til 10 µm snitt vha et frysemikrotom,

plassert på et Super Frost/Plus objekt glass (Menzel-Gläser, Braunschweig, Tyskland) og lagret ved – 20 °C. Snitt ble etter det lufttørket ved romtemperatur i 1 time, rehydrert i PBS og blokkert med PBS inneholdende 1% bovin serum albumin, 0,3% Triton X-100 og 0,1% natrium azid i 1 time ved romtemperatur. Snitt ble studert vha Olympus BV 61 FluoView Conococal Mikroskop (Olympus). Gjennomsnitt av sfærediametere ble hentet av 45 sfærer ved dag 10 etter den første passasje (P1). Bare sfærer med en rund og relativt glatt form ble inkludert (se fig. 3 og 4).

### **2.3 Transmisjon elektron mikroskop (TEM):**

Sfærene ble fiksert i 30-60 min ved romtemperatur vha nedsenking i ferskpreparert blandet aldehyd fiksering inneholdende 0,1M natrium cacodylate buffer, pH 7,4, inneholdende 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, og 0,025% CaCl<sub>2</sub> (REF Fliesler SJ art). Fiksasjon ble da fortsatt over natten ved 4 °C, postfiksert i 1% osmium tetroxid, og dehydrert vha en gradert serie av etanol opp til 100%. Sfærene ble så nedsenket i Propylene oxid i 20 min, før de ble lagt i Epon (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Ultratynne snitt (60-70 nm tykke) ble kuttet med et Leica Ultracut Ultramicrotome UCT (Leica, Wetzlar, Tyskland) og undersøkt med et CM120 transmisjon elektronmikroskop (Phillips, Amsterdam, Nederland).

### **2.4 Skanning elektronmikroskopi (SEM):**

Blandet-aldehyd fikserte sfærer ble dehydrert i økende etanol konsentrasjoner, pakket i filterpapir og tørket etter kritisk punkt metoden (polaron Ecq. Ltd, Watford, UK) ved bruk av CO<sub>2</sub> som overgangsvæske. Sfærene ble da forsiktig overført til karbon stumper og dekket med en 30nm tykt lag av platina i et Polaron E5100 sputter coater før de ble undersøkt og fotografert med et XL30 ESEM elektronmikroskop (Phillips).

### **2.5 Statistikk:**

Resultatene blir presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SD. Forskjeller ble testet med uavhengig utvalg t-test (Students t-test), og vurdert signifikant når  $p < 0,05$ . Alle data ble analysert vha SPSS versjon 14.0.

### **3. RESULTATER:**

#### **3.1 Enkeltceller blir nevrosfærer**

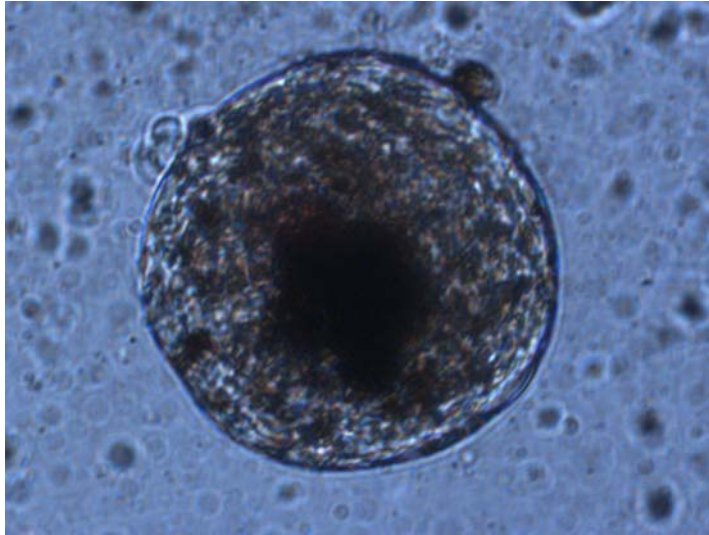
Cellene som ble suspendert i brønnene dannet etter repeterende celledelinger et cluster av celler (nevrosfære), som vist i fig 3 og 4. Cellene i sfæren inneholdt en mosaikk av både pigmenterte og upigmenterte celler. Først var sfæren dominert av celler med pigment. Etter sfæren utviklet seg, ble pigmentmengden forholdsvis mindre. Legg merke til den runde og glatte overflaten til sfærene. (fig 3 og 4)

#### **3.2 Cellene skaper en *in vitro* nisje.**

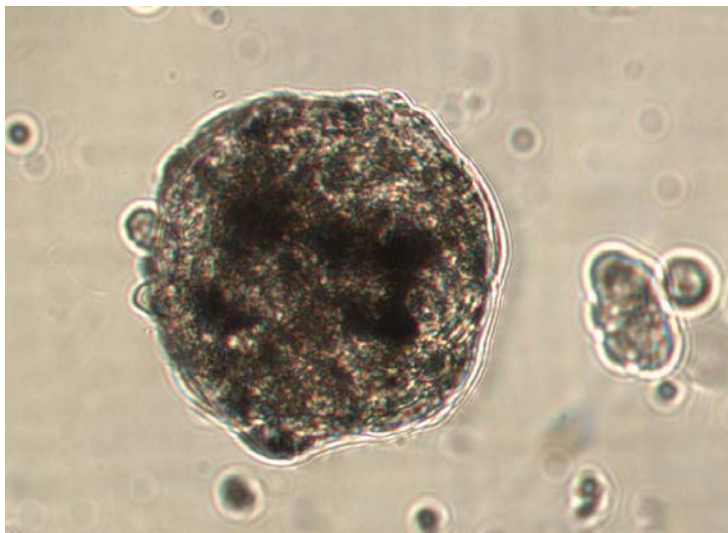
SEM bildene viser at cellene ytterst på en nevrosfære danner flate celler som interagerer med hverandre (se fig.5 og 6). Cellene ligger tett inntil hverandre med celleveggen vedt sammen.

Ut fra TEM bildene kan man se at det er forskjell på cellene lokalt i nevrosfæren (se fig.7 og 8). Sentralt i nevrosfæren er det runde celler, med en ukondensert kjerne uten nucleolus midt i cellen (fig.7). Det er sparsomt med organeller. Perifert er cellene mer polariserte, dvs kjernen er mer perifert i cellen (fig.8). Kjernen er kondensert, med tydelig nucleolus. Det finnes rikelig med organeller som RER og mitokondrier, noe som tyder på høy metabolsk aktivitet. Det sees også dannelse av cilier på overflaten av cellen. Ved bruk av ruthenium rødt, som farger mucopolysakkarider, ser man ekstracellulær matriks mellom cellene (se fig.9, ser også tegn på dette i fig.7 og 8). Perifert i nevrosfæren ligner cellene på pigmentepitelceller i organkultur, som tidligere EM studier fra vår lab har vist (17, 18).

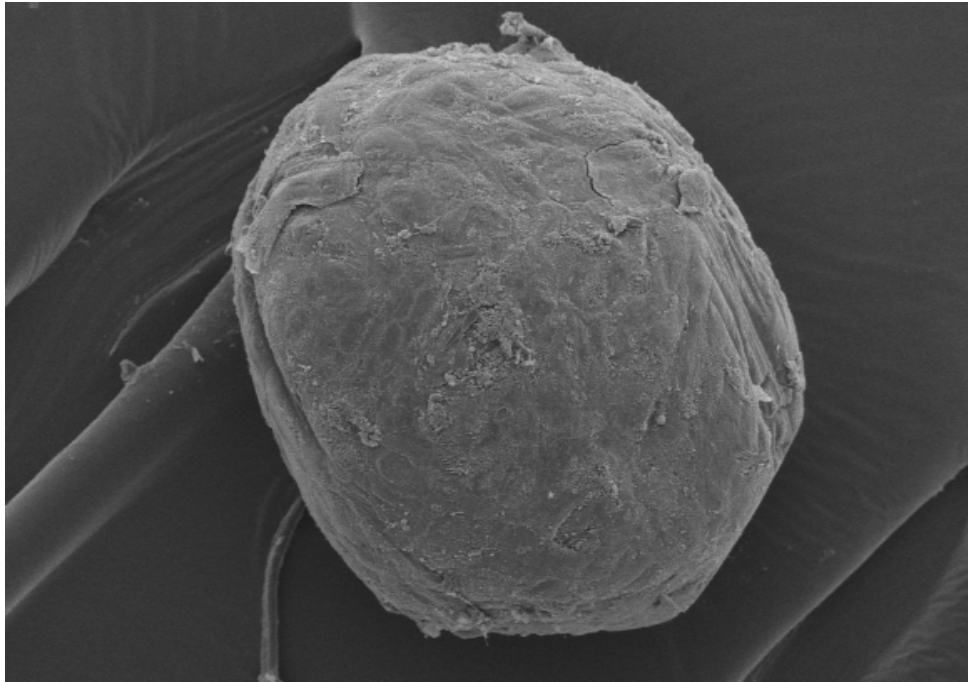
Det dannes derfor et hierarki hvor de sentrale cellene er mest udifferensiert, og de perifere er mer differensierte (se fig.7 og 8). Cellene skaper et mikromiljø hvor de kan interagere. Nevrosfæren kan ses som stamcellenes *in vitro* nisje.



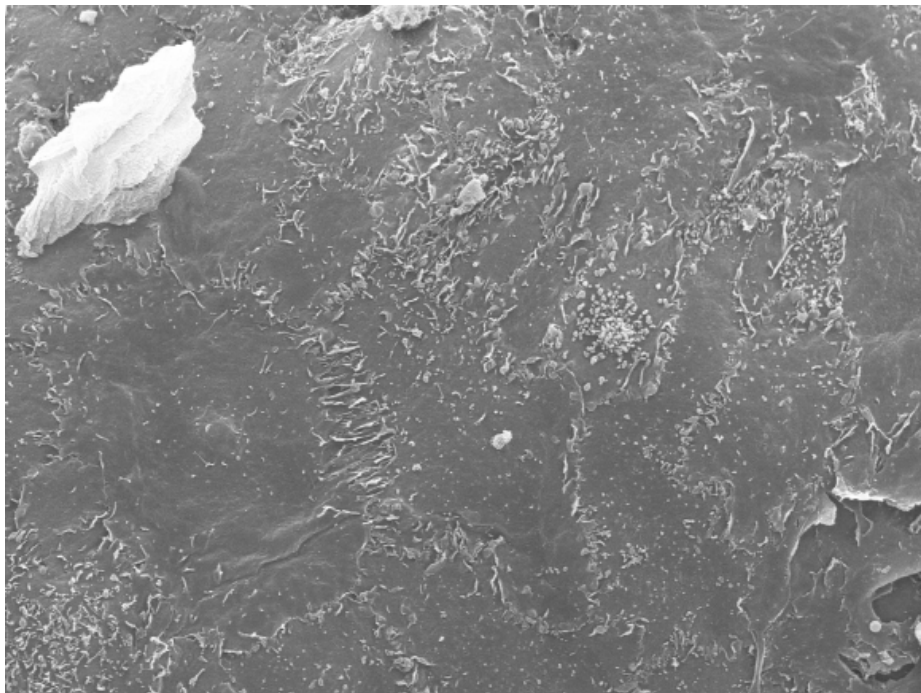
Figur 3. Nevrosfære fra ciliærlegemet til rotte, P1 (første passasje) - dag7. Lysmikroskop. Man kan tydelig se den runde, glatte overflaten.



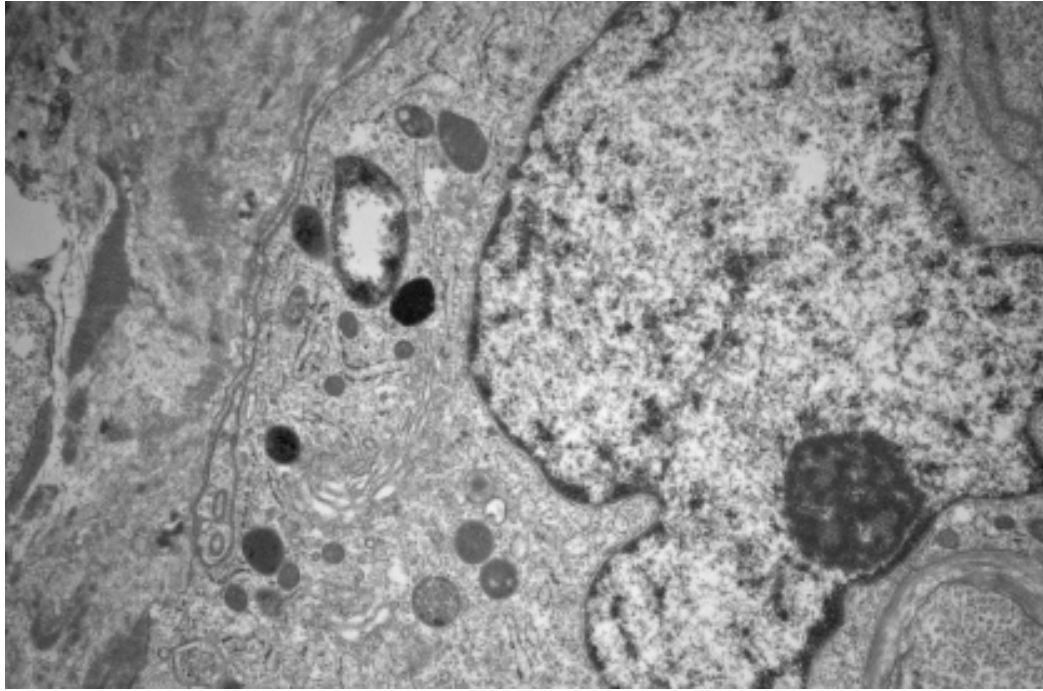
Figur 4. Nevrosfære fra human corpus ciliare. P1(første passasje) – dag 10. Lysmikroskop. Ikke like glatt som sfæren fra rotte, men allikevel rund. Man ser mørkere celler sentralt i sfæren.



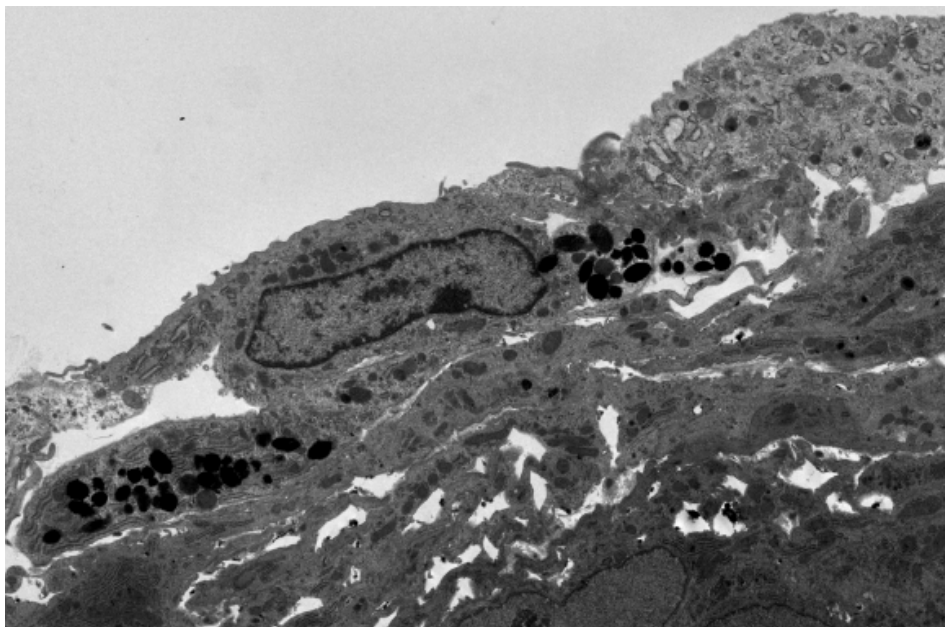
Figur 5. Nevrosfære fra human corpus ciliare. Skanning elektromikroskop (SEM), Forstørrelse x248. Man kan se at cellene danner en avflatet struktur. Sfæren er relativt rund og glatt.



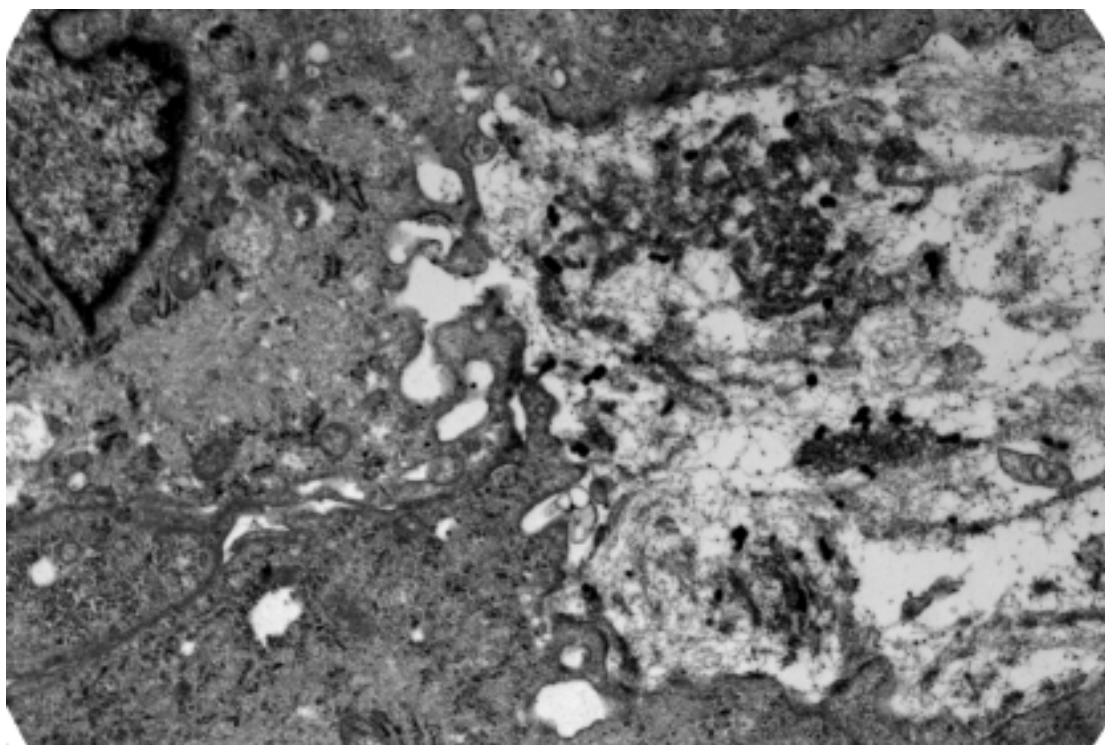
Figur 6. Nevrosfære fra human corpus ciliare. SEM, Forstørrelse x1125. Nærbilde av fig.5. Man kan se av celleveggene til de forskjellige cellene interagerer tett. Cellene har en tydelig avflatet struktur og ligner pigmentepitel i kultur.



Figur 7. Sentralt i nevrosfære fra human corpus ciliare. Transmisjon elektronmikroskop (TEM), forstørrelse x13500. Kjernene på cellene er sentralt lokalisert, med ukondensert DNA. Cellen er ikke polarisert. Det er sparsomt med organeller.



Figur 8. Perifert i nevrosfære fra rotte corpus ciliare. TEM, forstørrelse x5800. Her kan man tydelig se polarisert celle, med en kondensert kjerne, og nucleolus. Man ser også mange organeller. Det finnes rikelig med organeller som dilatert RER og mitokondrier. Det sees også dannelse av cilier på overflaten av cellen.



Figur 9. Nevrosfære fra human corpus ciliare. TEM, forstørrelse x20000. Farget med ruthenium rødt, som farger mucopolysakkarider i ekstracellulær matriks.

### **3.3 Størrelse på nevrosfærene:**

For å få et objektivt mål på hvor store nevrosfærene ble, målte vi diameteren i gjennomsnitt av sfærer ved dag 10 etter den første passasje (P1). Bare sfærer med en rund og relativt glatt form ble inkludert (se fig. 3 og 4).

Sfærer fra humant ciliærlegeme var  $134 \pm 50 \mu\text{m}$  (n=45) i diameter. Sfærer fra rotte ciliærlegeme var  $111 \pm 48 \mu\text{m}$  (n=45) i diameter (n=antall sfærer).

Dette er en statistisk signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ).

## **4. DISKUSJON:**

### **4.1 Eksperimentelt dyreforsøk:**

Ved å bruke nevrosfære-assay fant vi at celler fra corpus ciliare både fra rotte og menneske var i stand til å danne nevrosfærer etter 1. passasje. Ifølge Coles et al. er evnen til å danne sekundære sfærer et tegn på at man har dyrket en stamcelle (1). En stamcelle kan bare påvises retrospektivt, da den ikke uttrykker noen spesifikke markører en foreløpig kjenner.



Den kvalitative analysen av nevrosfærene ved bruk av bl.a elektron mikroskop viste at stamcellene danner sin egen nisje. Av denne kunnskapen kan man trekke at *in vitro* danner stamcellene et mikromiljø og differensierer autonomt ut fra dette miljøet. De selvgenererende stamcellene blir liggende sentralt, men de perifere cellene mister sitt stamcellepotensial. De blir derimot mer metabolsk aktive.

Størrelsen i diameter av nevrosfærene var i gjennomsnitt forskjellig fra menneske og rotte. Noe av årsaken til denne forskjellen kan være at de humane cellene ble tilsatt human spesifikk Sonic hedgehog (shh). En annen grunn kan være at det er lettere å identifisere corpus ciliare hos mennesker til forskjell fra rotter. Dette kan ha gitt flere aktive stamceller.

#### **4.1.1 Regenerasjon og differensiering:**

I utgangspunktet burde man teste både for cellenes evne til regenerasjon og til multidifferensiering for å kunne kalle den for stamcelle. Dette har blitt gjort flere ganger tidligere, og pga tidsmangel under oppgave vil jeg bare redegjøre for hvordan en kunne gjort dette.

For å teste om cellene virkelig har proliferert fra en celle, kan man tilsette Bromodeoxyuridine (BrdU) til vekstmediumet. BrdU er en thymidin analog, og vil inkorporeres i celler som deler seg. Hvis mange celler i en koloni uttrykker BrdU, er det et uttrykk for at cellene deler seg i koloniene (12). Mayer et al peker allikevel på en feilkilde; celler som foretar DNA repair får også inkorporert BrdU i sitt arvestoff (7). Sun et al merket noen celler med Qdot nanokrystaller og dyrket cellene sammen med umerkede celler, og så at nevrosfærene som ble dannet ikke inneholdt både Qdot merkede og umerkede celler (13). Det vil si at nevrosfærene ble dannet individuelt. En annen metode brukt av Coles et al, er å legge én celle i én brønn for å se at sfæren som dannes ikke er et resultat av celleaggregering og hypertrofi (1). Da må nevrosfæren være dannet fra denne ene cellen. Hvis en dissosierer nevrosfæren til enkeltceller igjen og får dannet nye nevrosfærer av enkelt celler, er dette et sterkt bevis på en selvfornyende evne hos cellen.

For å teste cellens evne til å differensiere, tilsettes cellekulturen faktorer som induserer differensiering. Det gjøres ofte i et medium som er adherent, f.eks belagt med collagen eller laminin. Tropepe et al brukte laminin-dekkede brønner (50 mg/ml; GIBCO) i medium inneholdende 1% bovint kalveserum, FGF2 (10 ng/ml), og heparin (2 mg/ml) (12). Etter dette brukte de immuncytokjem, dvs de brukte kjente antistoffer

mot antigener som man vet er egne for en spesiell celletype. For eksempel uttrykker udifferensierte nevrale celler nestin og pax 6, fotoreseptorer uttrykker Rho4D2 og Rom1, og müllerceller uttrykker 10E4 og vimentin og så videre (1). Ved hjelp av lysmikroskop og elektronmikroskop ser en også etter morfologiske markører for at stamcellen har differensiert i flere retninger, f. eks mulige utløpere fra cellen som ligner aksoner. Videre kan man analysere cellens RNA produkter for spesifikke gen-ekspressjoner.

#### **4.1.2 Feilkilder:**

Metoden som ble brukt er velprøvd (12, 15). Forsøkene ble gjort i nært samarbeid med veileder. Man begrenset oppgaven til å prøve å få til det andre hadde gjort før, noe som i og for seg er viktig for å danne en teori etter naturvitenskapens dogme. En svakhet ved forsøket var at det var få forsøk i antall, pga oppgavens tids og resursbegrensing.

Ett av problemene med arbeidet var å isolere celler fra rotteøyne, da corpus ciliare er en liten struktur hos rotter. Treffsikkerheten ble prøvd bedret gjennom bruk av operasjonsmikroskop. Antall vellykkede isoleringer økte ettersom ferdighetene økte. Isolering av menneskevev var lettere, pga større og derfor mer identifiserbare strukturer. EJ Mayer et al peker på at man ikke kan, uten tvil, skille retina fra RPE og choroidea i pars plana (fig.2). Det kan tenkes at det kommer med celler som stammer fra retina, pigmentepitel, choroidea og blod i det vevet vi isolerte fra øynene, på grunn av den mekaniske forstyrrelsen. Tropepe et al brukte en mer nitidig prosedyre for å isolere pigmentepitelceller fra bruchs membran (12). Med tanke på at stamceller er sjeldne (ca 0,6%), og at vi har fått lignende resultat som tidligere, er det høy sannsynlighet for at våre celler er fra corpus ciliare.

Et annet problem var å unngå å få infeksjon i brønnene. Særlig fokus på hygiene var viktig for resultatet. Man brukte i tillegg antibiotiske midler.

Variabelt tidsrom fra død til høsting og kultivering av humane celler kan spille inn på våre resultat. Det er imidlertid en feilkilde som er vanskelig å korrigere for når en arbeider med humant vev.

### **4.1.3 Etiske aspekter:**

Oppgaven min var en del av veileders prosjekt. Det var i tråd med Helsinki deklarasjonen, samt tilrådd av Regional Etisk Komité og Biobank opprettet etter godkjenning fra Sosial – og helsedirektoratet. Alle forsøk ble gjort i samarbeid med veileder. Det humane vevet som ble brukt i forskningen vår, var overskuddsvev fra øyevev donert til hornhinnetransplantasjoner ved Øyeavd, Ullevål Universitetssykehus. Vevet hadde blitt destruert hvis det ikke ble brukt til forskning.

Forsøkene med rotte i prosjektet var godkjent av den lokale forskningskomiteen for dyreforsøk ved Senter for Komparativ Medisin, Rikshospitalet Universitetssykehus. Alle dyreforsøk ble utført sammen med veileder.

## **4.2 Klinisk bruk av stamceller:**

### **4.2.1 Bruk av stamceller generelt:**

Det er mulig å tenke seg at en kunne erstatte celletapet med nye friske celler, som integreres i organismen og gjenoppretter funksjon. Det er i essensen det man gjør når man transplanterer hjerte, lunge, lever, nyre og benmarg. Med stamceller og genteknologi håper man å kunne erstatte alle vev, inkludert nervevev, og kanskje gjøre dette med en mer elegant og mindre invasiv metode enn dagens kirurgiske metoder. Kanskje kan man dekke noe av etterspørselen etter nye organer, hvis man kan få stamceller til å overta funksjonen til syke hjerteceller, leverceller eller pankreasceller. I beste fall kan man unngå den intensive immunsuppresjonsbehandlingen som transplanterte pasienter i dag må gjennomføre, ved å bruke immunkompatible celler. Eksperimentell bruk av stamceller i dag er f. eks mot Parkinsons sykdom, diabetes og hjertesvikt (19).

Rutinemessig bruk av stamceller i dag er f. eks stamcellestøttet behandling ved blodsykdommer, der man gir stamceller i form av benmarg til pasienter som har fått ødelagt sin stamcellepopulasjon i benmargen, pga f. eks kjemoterapi.

Innenfor øyefaget brukes epiteliale stamceller allerede. Limbale stamceller fra cornea og stamceller fra conjunktiva er lette å dyrke, og brukes for diverse skader og lidelser i cornea (20, 21).

### **4.2.2 Bruk av stamceller for retinale sykdommer:**

Flere retinale sykdommer kan tenkes kurert ved hjelp av stamceller, men patogenesen sier noe om hvor vanskelig det kan være. Retina er et komplisert

ledningsnettverk av celler. Skal en stamcelle gjenopprette funksjon i en degenerert retina, må stamcellen transplanteres til øyet og integrere i ledningsnettverket, eller eventuelt danne et helt nytt ledningsverk. Ved noen degenerative øyesykdommer, som retinitis pigmentosa, er det i hovedsak fotoreseptorene som går til grunne (9). Da trenger man bare å erstatte en celletype, siden de andre celletypene er relativt bevart. Det virker intuitivt lettere enn å gjenskape alle lag av retina (22).

I følge Xu et al. er glaukom en følge av døde ganglionceller, mens resten av retinas lag er relativt velbevart (8). Nydannelse av ganglionceller ved hjelp av transplanterte stamceller, kan gjenopprette synsfunksjon hos disse pasientene. Glaukom er den nest største årsaken til blindhet i verden.

Det er noen hovedproblemer som må løses før klinisk anvendelse av stamceller blir et faktum. Et problem er å kunne kontrollere stamcellens differensiering i ønsket retning. Et annet problem er å få til en vellykket transplantasjon av celler fra donor til mottaker. Hva som skjer med cellen etter transplantasjon krever kunnskap om kroppens respons på fremmede celler. For å utvikle vellykkede behandlingsmetoder, er dyreforsøk med større dyr som er mer like mennesker et viktig steg. Young foreslår forsøk med gris (23).

#### **4.2.2.1 Kontroll av differensiering:**

Et av hovedproblemene med forskning på stamceller er vår manglende evne til å styre differensiering. Mange forsøk har utforsket molekylære mekanismer som styrer cellens skjebne i virveldyrs retina. En modell som beskriver samspillet av faktorer som styrer denne utviklingen til en funksjonell retina mangler allikevel fortsatt (2). Utvikling av protokoller som styrer differensieringen til cellene i retning av en spesifikk fenotype vil være et viktig neste steg i forskningen. (8)

#### **4.2.2.2 Transplantasjon:**

Å transplantere celler eller vev til donor er et praktisk problem. Så langt har forsøk på å transplantere hjerne- og retina deriverte stamceller til voksen retina vært mislykkede. Stamcellene har vist liten evne til å kunne integrere til det ytre nukleære lag og differensiere til nye fotoreseptorer (22). Forsøk på enkel leveranse gjennom å sprøyte celler inn i corpus vitreum har i de fleste tilfeller vært ufruktbare. I noen forsøk overlevde cellene, men ble liggende ved innstikkstedet og dannet en rosettformasjon (1, 9, 22).

Coles et al. får i noen tilfeller overlevelse, migrasjon, differensiering og morfologisk integrasjon av donor celler til vertsretina, etter transplantasjon av stamceller fra corpus ciliare hos postmortem humane øyne til immunsupprimerte mus (1). Dette er etter innsprøyting av celler til corpus vitreum. Man hadde i dette forsøket ingen mulighet for å teste synsforbedring da vert hadde egenfunksjon av retina.

MacLaren et al, 2006 viser i et forsøk med mus, at man kan integrere donorceller med adult eller degenererende retina (22). Dette var hvis donorcellene blir tatt fra donor sammenfallende med toppen av stav-fotoreseptor formasjonen (fig.1). I dette forsøket var donoralder fra 1 dag – 7 dag postnatal. Disse cellene integrerer, differensierer og danner synapser som forbedrer synsfunksjonen hos rhodopsin knock-out mus. Synsfunksjonen ble vurdert ved hjelp av blant annet pupillerefleks ved svakt lys. Konklusjonen i denne studien var at identifisering av det rette ontogenetiske stadiet i fotoreseptorutviklingen hos donorcellene var viktig for å få vellykket integrasjon hos vert. I tillegg var også måten cellene ble transplantert viktig, da transplantasjon til corpus vitreum var mislykket, mens de vellykkede resultat kom etter transplantasjon til det subretinale rom.

Det er uklart hvorfor Coles et al. mener at et subretinal depot er feil og corpus vitrum depot er rett, og MacLaren et al. mener stikk motsatt. I MacLarens et al. tilfelle skulle cellene til fotoreseptorlaget, og det er kortere vei fra det subretinale rom til fotoreseptorlaget, enn veien fra corpus vitrum. Det kan forklare noe av forskjellen. Andre faktorer, som mikromiljøet i verten kan forklare donorcellenes inkonsekvente skjebne.

Hva som skjer med donorcelle i verten avhenger mye av vertens mikromiljø. En faktor er immunologi. En annen faktor er hvilke signaler som dominerer i en syk eller degenererende retina. Meyer et al. og MacLaren et al. prøvde begge forskjellige modeller for en syk retina, og fikk varierende resultat avhengig av dette. Som nevnt er det behov for å kunne tilpasse differensieringen i ønsket retning. Det er også viktig å vite mer om interaksjonen vert-donor for å kunne forutsi differensieringen til retinale stamceller (9, 22).

På grunn av den dårlige integrasjonen av celler ved bruk av enkel innsprøyting av celler til corpus vitrum eller det subretinale rom, ser Young for seg at en konstruerer et tredimensjonalt vev, f. eks ved hjelp av nedbrytbare polymerer som stillas (23). Da vil man ta hensyn til at celler har en polaritet, og man vil forhåpentligvis få en bedre organisering av cellene. Kanskje kan man danne alle

retinas lag in vitro, og etter det kan man transplantere et helt graft in toto. Det vil forhåpentligvis forbedre overlevelse og integrering.

#### **4.2.2.3 Immunologi:**

Øyet har siden oppdagelsen av transplantasjonsimmunologi av Sir Peter Medawar vært oppfattet som et immunprivilegert organ (2). Det ble antatt at det skyldtes manglende lymfedrenasje, og at privilegiene skyldtes immunologisk ignoranse. Det vi vet nå er at situasjonen ikke er så enkel, og at immunologisk ignoranse bare spiller en liten rolle. Derimot er utskillelse av faktorer som beskytter immunprivilegerte steder mot immunsystemet av større betydning. I forbindelse med allotransplantasjon av stamceller, fra embryo eller andre donorer, vil kunnskap om øyets immunologi være av stor betydning for å få et vellykket resultat.

Noen forskere utreder muligheten for autotransplantasjon. Der man tar celler fra pasienten og behandler de in vitro, for å transplantere dem tilbake. Dette vil i beste fall forbigå alle problemene med transplantat rejeksjon (2, 8).

#### **4.2.2.4 Behov for studier av større dyr:**

Young peker på problemene med forskning på små dyr som rotter (23). De har små øyne, lite corpus vitrum, og lav tapp/stav ratio. Det betyr at en ikke kan sammenligne rotte og menneske direkte. Grisens øye ligner menneskets i størrelse, struktur og form. Fremskritt i form av transgene griser gir mulighet for forskning på grisemodeller av forskjellige retinale sykdommer. Forsøk med gris vil gi en mulighet for å etterligne en eventuell behandling hos mennesket. Det vil være et neste steg på veien til vellykkede kliniske forsøk med mennesker.

### **4.3 Andre strategier:**

For å få nye celler til å integrere i en syk retina kreves en god del mer kunnskap enn det vi har i dag. Det vil ikke si at det ikke kan gå, det bare kreves nitidig forskning. Forskere med små, men konkrete mål kan avdekke nye sider ved saken (2, 23). Men ny kunnskap kan være brukbar på kort sikt. Noen forskere inkludert undertegnede og veileder, har tro på å kunne bruke stamceller som et substrat for å frigi beskyttende faktorer i en syk retina (2, 6, 8).

#### **4.3.1 Bruk av stamceller til produksjon av beskyttende faktorer:**

Man kan se for seg at man høster stamceller/progenitorceller direkte av pasienten (8). Corpus ciliare er relativt lett tilgjengelig for kirurgi. Så kan man genmanipulere cellene til å danne beskyttende faktorer *in vitro*, f. eks anti-angiogenetiske eller anti-inflammatoriske faktorer. Deretter kan man ekspandere cellekulturen til en tilstrekkelig størrelse, for så å tilbakeføre cellene til pasienten. Da vil de kunne integrere i retinas lag, pga de er ikke vevsfremmede, og produsere beskyttende faktorer. Dette kan hindre den destruerende angiogenesen eller inflammasjonen, som er årsaken til flere retinale sykdommer.

Dette kan være et alternativ til dagens behandling. Per dags dato brukes mye midler på å sprøyte VEGF – antagonister inn i corpus vitreum for å forhindre angiogenese ved f. eks proliferativ AMD. Medikamenter som Macugen og Lucentis koster mye penger. Macugen behandling av en pasient koster ca 63000 NOK per år pluss utgifter til personal og utstyr (felleskatalogen, 2007). Behandlingen krever en invasiv prosedyre hver sjette uke (Macugen), som har stor risiko for endoftalmitt hver gang, 1,3% per pasient per år (24).

Semkova et al. har en artikkel om bruk stamceller fra iris pigmentepitel til produksjon av beskyttende faktorer (6). At iris pigmentepitel inneholder stamceller er mindre dokumentert av andre, men til gjengjeld er iris enda mer tilgjengelig for kirurgi enn corpus ciliare.

Autogene stamceller fra corpus ciliare har begrenset proliferativ evne (8). Det rapporteres allikevel at en kan produsere nok celler til å få en behandlingsmetode til å fungere. Da slipper man muligens også problemer med tumordannelse, som er en risiko ved f.eks embryonale stamceller. Derfor er disse autogene stamceller fra corpus ciliare kanskje de mest anvendelige cellene på kort sikt, iallfall hva vedrører mulige kliniske forsøk (8).

Kanskje kan man bremse sykdomsprogresjonen til AMD (6). Diabetes retinopati skyldes også nydannelse av patologiske blodkar og inflammasjon, og kan tenkes behandlet på denne måten. Disse to sykdommene er vanlige årsaker til synstap og blindhet.

## **5. KONKLUSJON:**

Våre resultat viser at corpus ciliare fra menneske – og rotte inneholder celler med stamcelle/progenitor egenskaper, og vi bekrefter derfor andres funn. Nevrosfære assay er en enkel metode for å ekspandere stamceller *in vitro*. Sfærene fra menneske var større enn fra rotte. Det kan skyldes en grunnleggende arts forskjell, men kan også skyldes bruk av forskjellig vekstmedium for de to artene. Videre viser vårt arbeid at nevrosfærene kan betraktes som stamcellenes *in vitro* nisje; cellene danner ekstracellulær matriks og et hierarki der cellene sentralt i sfæren er udiffereensierte, mens de perifere er mer differensierte og metabolsk aktive.

Litteraturen viser at kunnskap om stamceller kan få betydning for behandlingen av noen av de vanligste retinale sykdommer. Av de lovende terapimetodene vil jeg trekke frem bruk av stamceller til å produsere faktorer som beskytter mot patologisk angiogenese og inflammasjon. Ved å høste celler fra pasienten selv, burde man unngå noen av de problemene som oppstår ved transplantasjon av celler. Corpus ciliare virker som et egnet sted for å høste stamceller, da det er lett tilgjengelig for kirurgi, uten å true pasientens syn. Denne oppgaven bekrefter at stamceller fra corpus ciliare er lett å dyrke frem *in vitro*.

## **6. TAKK TIL:**

Jeg vil rette en stor takk til Professor Bjørn Nicolaisen, og medarbeidere ved Senter for øyeforskning, Øyeavdelingen, Ullevål universitetssykehus, for å gjøre arbeidet med denne oppgaven mulig. Jeg vil også få takke Morten C. Moe for god veiledning og for hans konstruktive kommentarer.

## **7. REFERANSER:**

1. Coles BL, Angenieux B, Inoue T, et al. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(44):15772-7.
2. Klassen HJ, Ng TF, Kurimoto Y, et al. Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45(11):4167-73.



3. Sadler TW. Langman's Medical Embryology 2005.
4. Geneser F. Histologi - på molekylærbiologisk grundlag; 2001.
5. Lawrence JM, Singhal S, Bhatia B, et al. MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells* 2007;25(8):2033-43.
6. Semkova I, Kreppel F, Welsandt G, et al. Autologous transplantation of genetically modified iris pigment epithelial cells: a promising concept for the treatment of age-related macular degeneration and other disorders of the eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(20):13090-5.
7. Mayer EJ, Carter DA, Ren Y, et al. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol* 2005;89(1):102-6.
8. Xu H, Sta Iglesia DD, Kielczewski JL, et al. Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(4):1674-82.
9. Meyer JS, Katz ML, Kirk MD. Stem cells for retinal degenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1049:135-45.
10. Ramon Y, Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. 1913(London, Oxford UP, 1928.): (Day RM, translator, from the 1913 Spanish edition).
11. Bjorklund A. Cell replacement strategies for neurodegenerative disorders. *Novartis Found Symp* 2000;231:7-15; discussion 6-20.
12. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000;287(5460):2032-6.
13. Sun G, Asami M, Ohta H, Kosaka J, Kosaka M. Retinal stem/progenitor properties of iris pigment epithelial cells. *Dev Biol* 2006;289(1):243-52.
14. Liu IH, Chen SJ, Ku HH, et al. Comparison of the proliferation and differentiation ability between adult rat retinal stem cells and cerebral cortex-derived neural stem cells. *Ophthalmologica* 2005;219(3):171-6.
15. Moe MC, Varghese M, Danilov AI, et al. Multipotent progenitor cells from the adult human brain: neurophysiological differentiation to mature neurons. *Brain* 2005;128(Pt 9):2189-99.
16. Slettedal JK, Lyberg T, Ramstad H, Nicolaissen B. Donor corneas for transplantation: a scanning electron microscopic study of the epithelium. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84(4):516-21.

17. Nicolaissen B, Jr., Nicolaissen BE, Beraki K, Kolstad A, Arnesen K, Armstrong D. Monolayered explants in the study of retinal pigment epithelial behavior in culture. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1982;60(6):873-80.
18. Nicolaissen B, Jr., Ulshafer R, Allen C, Nicolaissen A, Rubin ML. Behavior of human RPE cultured on Bruch's membrane and on necrotic debris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(5):813-22.
19. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport>.
20. Boulton M, Albon J. Stem cells in the eye. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(4):643-57.
21. Utheim TP, Raeder S, Utheim OA, et al. A novel method for preserving cultured limbal epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 2007;91(6):797-800.
22. MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 2006;444(7116):203-7.
23. Young MJ. Stem cells in the mammalian eye: a tool for retinal repair. *Apmis* 2005;113(11-12):845-57.
24. Larsen M, Sander B, Villumsen JE, Haamann PH, la Cour M, Lund-Andersen H. [Treatment of neovascular age-related macular degeneration with intravitreal vascular endothelial growth factor inhibitor--secondary publication]. *Ugeskrift for laeger* 2005;167(35):3301-5.